

⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Patentschrift
⑩ DE 196 27 162 C 1

⑤ Int. Cl. 6:
C07 K 14/435
C07 K 14/765

⑲ Aktenzeichen: 196 27 162.2-41
⑳ Anmeldetag: 5. 7. 96
㉑ Offenlegungstag: —
㉒ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 7. 8. 97

DE 196 27 162 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦③ Patentinhaber:

Fischer, Lutz, Dr., 38271 Baddeckenstedt, DE

⑦④ Vertreter:

Dr. Volker Vossius, Patentanwalt, Corinna Vossius,
Rechtsanwältin, Tilman Vossius, Rechtsanwalt,
81678 München

⑦② Erfinder:

Fischer, Lutz, Dr., 38271 Baddeckenstedt, DE;
Paißker, Fabian, Dipl.-Chem., 38106 Braunschweig,
DE

⑤⑤ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:

DE 31 47 847 A1
WO 94/14 835 A1
WULFF, Günter: Molekulares Prägen (Imprinting) in
vernetzten Materialien mit Hilfe von
Matrizenmolekülen - auf dem Weg zu künstlichen
Antikörpern. In: Angew. Chem. 1995, 107,
S.1958-1979;
Chemical Abstracts: Vol. 109, 1989, Ref. 89062m;
Vol. 125, 1995, Ref. 31881t;
J. Am. Chem. Soc. 113, S. 9366-9368;

⑤④ In ihrer Konformation fixierte und stabilisierte, kovalent vernetzte Imprint-Polypeptide, Verfahren zu deren
Herstellung und deren Verwendung

⑤⑦ Die Erfindung betrifft in ihrer Konformation fixierte und
stabilisierte, kovalent vernetzte Imprint-Polypeptide und Ver-
fahren zu deren Herstellung sowie deren Verwendungen.
Diese kovalent vernetzten, Imprint-Polypeptide (VIP) zeigen
ihre Eigenschaften sowohl in wässrigen als auch in organi-
schen Lösungsmittelsystemen und können daher in beiden
eingesetzt werden.

DE 196 27 162 C 1

BEST AVAILABLE COPY

DE 196 27 162 C1

Beschreibung

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft in ihrer Konformation fixierte und stabilisierte, kovalent vernetzte Imprint-Polypeptide (geprägte Polypeptide), z. B. Proteine, die in der katalytischen Synthese, Chromatographie und Analytik von chiralen Verbindungen sowie in der Biosensortechnik zur spezifischen Erkennung von Molekülen eingesetzt werden können, Verfahren zu deren Herstellung und ihre Verwendung.

Stand der Technik

Polymere mit der Eigenschaft zur selektiven Erkennung von Molekülen sind in der Biotechnologie und Chemie von größter industrieller Bedeutung. Dazu zählen die zur Stoffklasse der Proteine zählenden Enzyme, Antikörper und Rezeptoren. Diese Polymere besitzen aufgrund ihrer dreidimensionalen Molekülstruktur (Konformation) für bestimmte Moleküle (Substrate, Antigene, Hormone etc.) komplementäre Bereiche, die als Bindungsstellen bezeichnet werden. Da native Polymere oftmals gerade kommerziell interessante Moleküle unzureichend oder gar nicht binden oder die zur Bindung nötige Konformation unter den Anwendungsbedingungen nicht genügend stabil ist, sind Methoden entwickelt worden, um maßgeschneiderte Polymere herzustellen, die die gewünschte Komplementarität aufweisen (K. Mosbach and O. Ramström, *Biotechnology*, Vol. 14 (1996), 163—170).

Goldstein, *Methods Enzymol.* 19 (1970), 935—962, und Fritz et al., *Angew. Chem.* 78, 1966, 775 beschreiben ein Verfahren zur Immobilisierung von Proteinen unter Verwendung von cyclischen Anhydriden für die kovalente Kopplung. Das Verfahren besteht darin, zuerst ein Anhydrid zu einer Trägermatrix mit anderen Monomeren zu copolymerisieren und anschließend das Protein an den fertigen Träger zu koppeln.

Mosbach und Ramström (loc. cit.) beschreiben, daß die Herstellung maßgeschneiderter Polymere mit der gewünschten Komplementarität in zwei Varianten durchgeführt wird. Beiden Varianten liegt das Prinzip zugrunde, daß ein speziell ausgesuchtes Molekül, im folgenden Printmolekül (Prägemolekül) genannt, als Formgeber (Präger) fungiert und für die im Polymer gewünschte Komplementarität und damit neue Eigenschaft verantwortlich ist. Fig. 1 und 2 erläutern schematisch diese beiden Varianten.

Die Variante 1 zur Herstellung von maßgeschneiderten (geprägten) Polymeren wird so durchgeführt, daß in Gegenwart des Printmoleküls eine Copolymerisation ausgesuchter Monomere in einem organischen Lösungsmittel durchgeführt wird (siehe Fig. 1). Dabei werden zunächst das Printmolekül a) direkt zusammen mit einem Monomer (nicht-kovalente Methode) oder b) nach Derivatisierung mit einem Monomer (kovalente Methode) in einem organischen Lösungsmittelsystem gelöst, sodann wird ein Crosslinker und ein Radikalstarter zugegeben und die Polymerisation gestartet. Aus dem resultierenden Polymer muß anschließend das Printmolekül unter geeigneten Bedingungen extrahiert werden, damit die erzeugten neuen Bindungsstellen im Polymer frei werden. Das auf diese Weise hergestellte Polymer hat selektive Wiedererkennungsstellen für das Printmolekül bzw. für strukturell ähnliche Moleküle (siehe Fig. 1).

Essentiell für a) und b) ist, daß sowohl die Lösung der Ausgangssubstanzen, die sich aus bestimmten Konzentrationen an Printmolekül, Monomer(en) und Radikalstarter zusammensetzt, als auch die anschließend im Polymer erzeugte, maßgeschneiderte (geprägte) Eigenschaft, bisher ausschließlich auf die Verwendung von organischen Lösungsmittelsystemen angewiesen ist.

In der Variante 2 wird zur Erzeugung eines maßgeschneiderten (geprägten) Polymers keine Polymerisation in Gegenwart eines Printmoleküls durchgeführt, sondern ein bereits fertiges natives Polymer, z. B. ein Polypeptid oder ein Protein, wird unter bestimmten Bedingungen und durch die Gegenwart des Printmoleküls zu einer Konformationsänderung gezwungen (siehe Fig. 2). Dazu wird zuerst das Polymer zusammen mit dem Printmolekül in einem wässrigen Lösungsmittelsystem gelöst und anschließend durch Zugabe von Additiven, z. B. organischen Lösungsmitteln, präzipitiert. Dabei interagieren das Printmolekül und das Polymer über nichtkovalente Wechselwirkungen derart miteinander, daß die Konformation des Polymers verändert wird und das Polymer dadurch eine neue Eigenschaft hat, die inhärent durch das Printmolekül vorgegeben ist. Der bis zu diesem Punkt beschriebene Vorgang der Variante 2 wird im folgenden als Imprinting (Prägen), das daraus resultierende Polymer als Imprint-Polymer (geprägtes Polymer), z. B. Imprint-Polypeptid bezeichnet.

Die neue Eigenschaft des Imprint-Polymers ist jedoch reversibel. Sie bleibt nur erhalten, solange es unter Bedingungen verwendet wird, die die Rückbildung zur ursprünglich thermodynamisch günstigeren Konformation unterbindet. Daher können die durch Variante 2 erhaltenen Polymere, die von Mosbach et al. loc. cit., Stähli et al., *Biotechnol. Lett.* 12 (1990), 161—166; Stähli et al., *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991), 9366—9368 und Klibanov et al., *J. Biol. Chem.* 263 (1988), 11624—11626 und Dabulis and Klibanow, *Biotechnol. Bioeng.* 39 (1992), 176—185 beschrieben wurden, nur in organischen Lösungsmitteln Anwendung finden.

Es sind zwei Möglichkeiten des Imprintings zu unterscheiden (siehe Fig. 2). Die eine erzeugt an dem Polymer vorher nicht vorhandene, reversible Bindungsstellen für das Printmolekül, die zweite modifiziert die Stereo- und/oder Substratspezifität eines Polymers, z. B. eines Enzyms durch die Interaktion des Printmoleküls mit dem aktiven Zentrum. Die erste Möglichkeit ergab bei der Verwendung von Rinderserumalbumin als Polypeptid und L-Äpfelsäure als Printmolekül ein Imprint-Polypeptid, welches in chromatographischen Untersuchungen für das Printmolekül L-Äpfelsäure selektiv war (Dabulis and Klibanow, loc. cit.). Die zweite Möglichkeit führte bei Hydrolysen zu erweiterten, neuen Katalyseeigenschaften dieser Enzyme. So wurden z. B. die Substratspezifität von Subtilisin (Russel and Klibanow, loc. cit.) und die Stereo- und Substratspezifität von α -Chymotrypsin (Stähli et al., loc. cit.) gerichtet verändert. Das Polypeptid α -Chymotrypsin beispielsweise besitzt die Eigenschaft,

DE 196 27 162 C1

das (L)-Enantiomer des N-Acetyl-tryptophanethylesters (N-Ac-TrpEE) in einem wäßrigen Lösungsmittelsystem zu hydrolysieren bzw. in einem organischen Lösungsmittelsystem aus N-Acetyl-L-tryptophan (N-Ac-Trp) und Ethanol zu synthetisieren. Das (D)-Enantiomer des N-Ac-TrpEE kann weder hydrolysiert noch synthetisiert werden.

Wird dieses Polypeptid α -Chymotrypsin jedoch mit dem Printmolekül N-Ac-(D)-Trp imprintet (geprägt), kann es anschließend im organischen Lösungsmittel die Synthese des N-Ac-(D)-TrpEE aus N-Ac-(D)-Trp und Ethanol katalysieren; da die Konformation des Polypeptids durch das Printmolekül gezielt verändert wurde (Stahl et al, loc. cit.). Die Konformationsänderung ist jedoch reversibel. Daher kann das Imprint-Polypeptid nicht im wäßrigen Lösungsmittelsystem zur Hydrolyse des N-Ac-(D)-TrpEE eingesetzt werden. Die neue Eigenschaft geht verloren, wenn das Imprint-Polypeptid mit wäßrigen Lösungsmittelsystemen in Kontakt kommt.

Limitierend für die bisher durchgeführte Methode des Imprintings ist also, daß die Imprint-Polypeptide labil sind und ausschließlich im organischen Lösungsmittelsystem ihre imprinteten (geprägten), neuen Eigenschaften aufweisen bzw. behalten. Die Konformation der Imprint-Polypeptide basiert auf empfindlichen, nicht-kovalenten Bindungen. Sobald diese mit wäßrigen Lösungsmittelsystemen in Kontakt kommen, sind die durch das Imprinting (Prägen) induzierten Eigenschaften nicht mehr nachweisbar und irreversibel verloren, da die induzierte Konformationsänderung in wäßrigen Systemen energetisch ungünstig ist. Wäre eine kovalente Fixierung und Stabilisierung der Konformation der Imprint Polypeptide möglich, könnten sie anschließend ebenso im wäßrigen Milieu eingesetzt werden. Die imprintete Konformation wäre kovalent fixiert und nicht ohne Spaltung der geknüpften Bindungen verloren. Wassermoleküle könnten die imprintete Konformation nicht mehr aufheben. Es entstünden völlig neue Perspektiven zur Nutzung von Imprint-Polypeptiden, da eine Vielzahl kommerziell bzw. industriell relevanter Prozesse in wäßrigen Lösungsmittelsystemen stattfindet. Beispielsweise sind viele interessante Verbindungen nur oder besser in wäßrigen Systemen löslich und die katalytische Aktivität von Polypeptidkatalysatoren ist ebenfalls in wäßrigen Systemen höher und damit überhaupt erst kommerziell nutzbar.

So könnten z. B. im wäßrigen Milieu ablaufende Verfahren, die aufgrund zu geringer oder keiner Aktivität der verfügbaren Polypeptidkatalysatoren (Enzyme) gegenüber einem kommerziell nutzbaren Substrat bisher nicht zur Anwendung gekommen sind, durch das Fixieren der Konformation des Imprint-Polypeptids zu einer erheblichen Produktivitätssteigerung führen (Erweiterung der Katalyseeigenschaft). Bestehende Verfahren mit nativen Polypeptiden könnten durch die Verwendung von in ihrer Konformation fixierten und stabilisierten Imprint-Polypeptiden eine enorme Effizienzsteigerung erfahren. Konformationsfixierte Imprint-Polypeptide, die selektiv das Printmolekül und/oder dessen strukturell ähnliche Verbindungen in wäßrigen Systemen erkennen sollen, könnten als künstliche Antikörper in der wäßrigen Analytik, Sensortechnik oder Chromatographie, wie der Affinitätschromatographie, speziell in der Immunaффinitätschromatographie eingesetzt werden. Nach bisherigem Stand der Technik sind diese genannten Anwendungsmöglichkeiten in wäßrigen Systemen bisher nicht durchführbar.

Aufgabe der Erfindung

Somit liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, in ihrer Konformation fixierte und stabilisierte, kovalent vernetzte Imprint-Polypeptide zur Verfügung zu stellen, die auch in wäßrigen Medien eingesetzt werden können. Die neuen oder erweiterten Katalyse- und/oder Bindungseigenschaften der Imprint-Polypeptide sollen fixiert und stabilisiert werden. Damit ist der Verlust, d. h. die Reversibilität, der imprinteten Eigenschaft(en) der Polypeptide in wäßrigen Medien nicht mehr gegeben. Die Imprint-Polypeptide sind dann erstmals auch in katalytischen, chromatographischen und/oder analytischen Prozessen einsetzbar, die in wäßrigen Medien durchgeführt werden.

Zur Lösung dieser Aufgabe werden in ihrer Konformation fixierte und stabilisierte, kovalent vernetzte Imprint-Polypeptide, die sowohl in wäßrigen als auch in organischen Lösungsmittelsystemen stabil sind, zur Verfügung gestellt, die gemäß einer Ausführungsform durch die folgenden Schritte erhältlich sind:

- (A) kovalente Einführung von polymerisierbaren, ungesättigte Bindungen enthaltenden Gruppen in ein Polypeptid;
- (B) Imprinting des in Schritt (A) erhaltenen Polypeptids mit einem Printmolekül in einem wäßrigen Medium;
- (C) Präzipitation des in Schritt (B) erhaltenen Polypeptid/Printmolekül-Gemisches durch Zugabe eines zur Präzipitation geeigneten Additivs und/oder Gefrieretrocknen des in Schritt (B) erhaltenen Polypeptid/Printmolekül-Gemisches; und
- (D) Copolymerisation des in Schritt (C) erhaltenen Imprint-Polypeptids in einem organischen Lösungsmittel mit einem Crosslinker, der mit den polymerisierbaren, ungesättigte Bindungen enthaltenden Gruppen copolymerisierbar ist.

Gemäß einer anderen Ausführungsform sind die in ihrer Konformation fixierten und stabilisierten, kovalent vernetzten Imprint-Polypeptide, die sowohl in wäßrigen als auch in organischen Lösungsmittelsystemen stabil sind, erhältlich durch die folgenden Schritte:

- (A) kovalente Einführung von polymerisierbaren, ungesättigte Bindungen enthaltenden Gruppen in ein Polypeptid in einem wäßrigen Medium;
- (B) Imprinting des in Schritt (A) erhaltenen Polypeptids mit einem Printmolekül in einem wäßrigen Medium; und
- (C) Copolymerisation des in Schritt (B) erhaltenen Polypeptids in einem wäßrigen Medium mit einem

DE 196 27 162 C1

Crosslinker, der mit den polymerisierbaren, ungesättigte Bindungen enthaltenden Gruppen copolymerisierbar ist.

Weitere Lösungen der Aufgabe bestehen darin, den Schritt (B) vor dem Schritt (A) oder die Schritte (A) und (B) gleichzeitig durchzuführen.

Beschreibung der Erfindung

Das erfindungsgemäße Verfahren (siehe Fig. 3 und 4) umfaßt das selektive Einführen von polymerisierbaren, ungesättigte Bindungen enthaltenden Gruppen in ein gegebenenfalls imprintetes (geprägtes) Polypeptid, z. B. ein Protein. Nach Einstellung der gewünschten Polypeptidkonformation durch das Imprinting und das Präzipitieren oder Gefriertrocknen (Schritt (C)) umfaßt das erfindungsgemäße Verfahren den weiteren Schritt (D), daß selektiv an den ungesättigte Bindungen enthaltenden Gruppen der derivatisierten Polypeptide eine kovalente Vernetzung durch Copolymerisation mit einem Crosslinker, z. B. einer divinylisierten Verbindung, stattfindet, die die gewünschte Polypeptidkonformation kovalent fixiert und stabilisiert. Anschließend ist das kovalent vernetzte Imprint-Polypeptid sowohl in wässrigen als auch in organischen Lösungsmittelsystemen stabil und die imprintete Eigenschaft, z. B. eine veränderte Katalyse- und/oder Affinitäts Eigenschaft, kann für kommerzielle Anwendungen genutzt werden (siehe Fig. 3 und 4).

Für das Imprinting eignen sich Polypeptide mit beispielsweise Alkyl-, Aryl-, OH-, NH₂-, SH-, und/oder COOH-Gruppen, die zum einen mit dem Printmolekül über nicht-kovalente Bindungen, z. B. Ionen-, Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen, van der Waals-Kräfte, Metallchelatkomplexe, interagieren und zum anderen vor, während oder nach dem Imprinting kovalent mit Gruppen derivatisiert werden können, die polymerisierbare, ungesättigte Bindungen enthalten.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden Polypeptide mit OH-, NH₂- und/oder SH-Gruppen als Ausgangsverbindungen verwendet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden native Proteine als Polypeptide verwendet, vorzugsweise Enzyme, insbesondere β -Glucosidase oder α -Chymotrypsin.

Bevorzugte Enzyme werden ausgewählt aus Oxido-Reduktasen, wie D- und L-Aminosäure-Oxidasen, Alkoholdehydrogenase, Glucosoxidase und Formiatdehydrogenase. Weitere bevorzugte Enzyme sind ausgewählt aus Hydrolasen, wie Proteasen, Peptidasen (z. B. Rennin), Amylasen (z. B. α -Amylase, β -Amylase, Glucoamylase, β -Galactosidase), Glycosidasen, Acylasen, Lipasen und Esterasen.

Weiterhin können bevorzugte Enzyme ausgewählt werden aus Isomerasen, wie Glucoseisomerase und Aminosäure-Racemase.

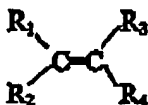
Als weitere bevorzugte Enzyme können Polymerasen, wie DNA-Polymerasen, Transferasen, wie Phosphotransferasen oder Ligasen, wie DNA-Ligasen verwendet werden.

Die Einführung der polymerisierbaren, ungesättigte Bindungen enthaltenden Gruppen wird in einem wässrigen Medium durchgeführt. Vorzugsweise liegt der pH-Wert des wässrigen Medium bei etwa 3 bis 12, vorzugsweise etwa 5 bis 8 und insbesondere bei etwa 6 bis 8. Gegebenenfalls kann das wässrige Medium ein Puffersystem enthalten. Vorzugsweise ist das Puffersystem ausgewählt aus einem Kalium-Phosphat-Puffer, einem Citronensäure-Phosphat-Puffer, Tris-Puffer (Tris(hydroxymethyl)aminomethan) oder einem Natrium-Phosphat-Puffer.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, daß die Einführung der polymerisierbaren, ungesättigte Bindungen enthaltenden Gruppen, vorzugsweise Vinylgruppen, in ein Polypeptid in selektiver Weise zu erfolgen hat. Ein Teil der funktionellen Gruppen der Polypeptide (OH-, NH₂-, SH-, COOH-Gruppen), der während des Imprintings im wässrigen Lösungsmittelsystem mit einem Printmolekül interagieren soll, soll nicht derivatisiert werden. Dies kann beispielsweise durch die Molverhältnisse von Polypeptid/olefinischer Verbindung gesteuert werden. Der Grad an Derivatisierung wird durch die jeweilige Primärsequenz des Polypeptids, die Aminosäurezusammensetzung, die Temperatur und den pH-Wert bestimmt. Der für den Erhalt der imprinteten Eigenschaft optimale Grad an Derivatisierung kann leicht überprüft werden, indem das nicht-derivatisierte Imprint-Polypeptid mit den in unterschiedlichem Grad derivatisierten Imprint-Polypeptiden hinsichtlich der gewünschten Eigenschaft(en) verglichen wird (Fig. 5).

Bevorzugte Molverhältnisse von Polypeptid/olefinischer Verbindung liegen im Bereich von etwa 1:5 bis 1:300.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden olefinische Verbindung oder deren Gemische, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus reaktiven Analoga bzw. Derivaten der allgemeinen Formel (I)



(I)

verwendet, wobei die Reste R₁, R₂, R₃ und R₄ unabhängig voneinander Wasserstoffatome, Carboxylreste, cyclische oder lineare, substituierte oder unsubstituierte, gesättigte oder ungesättigte Alkylreste, Alkoxyreste oder Carboxyalkylreste mit vorzugsweise bis zu 10, bevorzugter bis zu 6, insbesondere 1 oder 2 Kohlenstoffatomen oder substituierte oder unsubstituierte Arylreste oder Carboxyarylreste sind, mit der Maßgabe, daß minde-

DE 196 27 162 C1

stens einer der Reste R_1 , R_2 , R_3 und R_4 unabhängig voneinander ein Carboxyl-, Carboxyalkyl- oder Carboxyarylrest ist.

Vorzugsweise sind 1 oder 2, insbesondere 2 der Reste R_1 , R_2 , R_3 und R_4 unabhängig voneinander ein Carboxyl-, Carboxyalkyl- oder Carboxyarylrest, insbesondere Carboxyl- oder Carboxyalkylreste mit insbesondere 1 oder 2 Kohlenstoffatomen.

Vorzugsweise sind die Reste R_1 , R_2 , R_3 oder R_4 , die kein Carboxyl-, Carboxyalkyl- oder Carboxyarylrest sind, unabhängig voneinander Wasserstoffatome oder Alkylreste, bevorzugter Ethyl- oder Methylreste, insbesondere Methylreste.

Falls die Reste R_1 , R_2 , R_3 und R_4 substituierte Alkyl-, Carboxyalkyl-, Alkoxy-, Aryl- oder Carboxyarylreste sind, sind die Substituenten vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Halogenatomen, Nitro-, Amido-, Carboxyl-, Ester- und Alkoxyresten mit vorzugsweise bis zu 10, bevorzugter bis zu 5 und insbesondere 1 oder 2 Kohlenstoffatomen.

Falls die Reste R_1 , R_2 , R_3 und R_4 ungesättigte Alkyl-, Carboxyalkylreste oder Alkoxyreste sind, enthalten sie vorzugsweise bis zu 3, bevorzugter bis zu 3 und insbesondere eine ungesättigte Bindung.

Falls die Reste R_1 , R_2 , R_3 und R_4 substituierte oder unsubstituierte Arylreste oder Carboxyarylreste sind, sind die Arylreste vorzugsweise Phenyl- oder Naphthylreste, wobei die Substituenten vorzugsweise ausgewählt sind aus der vorstehend für substituierte Alkyl-, Carboxyalkyl-, Alkoxy-, Aryl- oder Carboxyarylreste genannten Gruppe.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Itacon-, Malein-, Citracon-, Croton-, Methacryl- und Acrylsäure verwendet.

Vorzugsweise werden olefinische cyclische oder nicht-cyclische Anhydride, wie Itacon-, Malein-, Citracon-, bzw. Croton-, Acryl- oder Methacrylsäureanhydrid, oder die Säurehalogenide, insbesondere die Säurechloride der genannten olefinischen Verbindungen zur Derivatisierung verwendet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird als olefinische Verbindung Itaconsäureanhydrid (ISA) in einem wässrigen Medium, vorzugsweise im pH-Bereich von etwa 3–12 verwendet, das selektiv und kovalent an OH-, NH₂- und/oder SH-Gruppen bindet (vgl. Tab. 3). Die Anzahl an ISA-Bindungen wird durch die individuelle Primärsequenz des Polypeptids, die Temperatur und den pH-Wert bestimmt. Der für den Erhalt der imprinteten Eigenschaft optimale prozentuale Anteil an möglicher Derivatisierung wird überprüft. Dazu wird das nicht-derivatisierte Imprint-Polypeptid mit den in unterschiedlichem Grad olefinisch derivatisierten Imprint-Polypeptiden hinsichtlich der gewünschten Eigenschaft(en) verglichen (Fig. 5).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden zur Stabilisierung der gewünschten Konformation bzw. zur Abschirmung der für das Imprinting wichtigen Funktionalitäten während des Derivatisierungsvorganges (Schritt (A)) Polyole, wie Polyethylenglykole, Sorbitol, Saccharose, Glucose und/oder Glycerin oder Salze zugesetzt, wie Ammonium-, Alkali- oder Erdalkalisulfate, -phosphate oder -halogenide, wie (NH₄)₂SO₄, Na₂SO₄, MgSO₄, Na₃PO₄, CaHPO₄, (NH₄)H₂PO₄, NH₄Cl, NaCl, KCl und CaCl₂. Damit besitzt dieser Verfahrensschritt viele Freiheitsgrade, um als Ergebnis ein funktionell aktives und derivatisiertes Imprint-Polypeptid zu erhalten.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist außerdem dadurch gekennzeichnet, daß das Polypeptid vor, während oder nach dem kovalenten Einführen von polymerisierbaren, ungesättigte Bindungen enthaltenden Gruppen mit einem Printmolekül im wässrigen Medium inkubiert wird. Das Printmolekül und das Polypeptid bilden dabei ein Polypeptid/Printmolekül-Gemisch, wobei das Printmolekül und das Polypeptid über nicht kovalente Wechselwirkungen interagieren. Dadurch wird die Konformation des Polypeptids verändert, das damit neue und/oder veränderte Eigenschaften hat.

Als Printmolekül kann vorzugsweise eine Verbindung verwendet werden, die eine hohe strukturelle und/oder chirale Ähnlichkeit mit dem späteren Substrat des fertigen in seiner Konformation fixierten und stabilisierten, kovalent vernetzten Imprint-Polypeptid hat oder mit dem späteren Substrat identisch ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird als Polypeptid α -Chymotrypsin und als Printmolekül N-Ac-(D)-Tryptophan, N-Ac-(D)-Tyrosin oder N-Ac-(D)-Phenylalanin verwendet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird als Polypeptid Rinderserumalbumin und als Printmolekül L-Äpfelsäure verwendet oder als Polypeptid wird D- oder L-Aminosäure-Oxidase und als Printmolekül werden natürliche oder nicht-natürliche (D)- oder (L)-Aminosäuren verwendet.

Außerdem ist das erfindungsgemäße Verfahren dadurch gekennzeichnet, daß das in einem wässrigen Medium gelöste Polypeptid/Printmolekül-Gemisch präzipitiert wird. Das Präzipitieren kann durch Zugabe von Additiven erfolgen, die zum Präzipitieren des Polypeptid/Printmolekül-Gemischs in wässrigem Medium geeignet sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden wassermischbare organische Lösungsmittel als Additive zum Präzipitieren verwendet, vorzugsweise Aceton, Methylethylketon, Methanol, Ethanol, Propanol und Butanol, insbesondere n-Propanol oder Isopropanol.

In einer weiteren Ausführungsform wird das Polypeptid/Printmolekül-Gemisch gefriergetrocknet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das Polypeptid/Printmolekül-Gemisch sowohl präzipitiert als auch gefriergetrocknet.

Über die polymerisierbaren, ungesättigte Bindungen enthaltenden Gruppen wird die imprintete Konformation des Polypeptids in einem weiteren Schritt durch Copolymerisation kovalent fixiert.

Die Copolymerisation wird vorzugsweise durch UV-Strahlung, Peroxide oder Radikalstarter (thermisch oder durch UV-Strahlung) initiiert.

Vorzugsweise werden als Radikalstarter Azobisverbindungen, wie α,α' -Azo-isobutyronitril (AIBN) oder 2,2'-Azo-bis-(2,4-dimethyl-valeriansäurenitril) (ABDV) verwendet. Insbesondere bevorzugt werden als Radikalstarter AIBN oder ABDV verwendet und die Copolymerisation wird mittels UV-Strahlung initiiert.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist weiterhin dadurch gekennzeichnet, daß für die kovalente Fixierung der

DE 196 27 162 C1

Konformation der nach der Präzipitation und/oder dem Gefriertrocknen erhaltenen derivatisierten Imprint-Polypeptide ein Crosslinker verwendet wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden als Crosslinker ungesättigte Bindungen enthaltende Verbindungen oder deren Gemische, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus



verwendet, wobei die Reste R_1 und R_3 unabhängig voneinander Wasserstoffatome, cyclische oder lineare, ungesättigte oder gesättigte, substituierte oder unsubstituierte Alkyl-, Carboxyl-, Carboxyalkyl- oder Alkyletherreste mit vorzugsweise bis zu 10, insbesondere 1 oder 2 Kohlenstoffatomen oder substituierte oder unsubstituierte Arylreste sind und der Rest R_2 ein cyclischer oder linearer, gesättigter oder ungesättigter, substituiert oder unsubstituierter Alkyl- oder Alkyletherrest mit vorzugsweise bis zu 10, insbesondere 1 oder 2 Kohlenstoffatomen oder ein Arylrest ist und n einen Wert von vorzugsweise bis zu 10 und insbesondere 1 oder 2 hat.

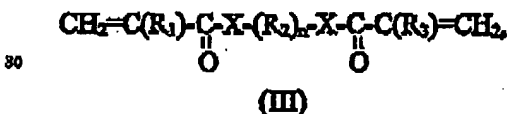
Vorzugsweise sind die Reste R_1 und R_3 Wasserstoffatome.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform können die Reste R_1 und/oder R_3 mehr als 10 Kohlenstoffatome enthalten. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat n einen Wert von größer 10. Spezielle Beispiele sind olefinische Polyethylenglykole oder olefinische Derivate von Polyacrylamiden.

Falls die Reste R_1 , R_2 und R_3 ungesättigte und/oder substituierte Reste sind, haben sie die für die allgemeine Formel (I) genannte Bedeutung. Zusätzlich zu den genannten Substituenten können Hydroxy- und/oder Amino-reste anwesend sein.

Vorzugsweise sind die verwendeten Crosslinker ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Divinylalkyl- und Divinylarylverbindungen, insbesondere Divinylbenzol oder 1,5-Hexadien.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die verwendeten ungesättigten Bindungen enthaltenden Crosslinker oder deren Gemische ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Analoga bzw. Derivaten der allgemeinen Formel (III)



wobei die Rest R_1 , R_2 und R_3 und n die vorstehend für die allgemeine Formel (II) genannte Bedeutung haben und der Rest X ein Sauerstoffatom oder die Gruppe $-NH$ ist.

Vorzugsweise sind die Crosslinker ausgewählt aus Ethylenglykoldimethacrylat, N,N'-Methylen-bis-acrylamid, Ditaconsäurealkylamiden und Ditaconsäurearylamiden.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Copolymerisation in Cyclohexan, Toluol, Aceton, Alkanole, Essigsäureethylester, Tetrahydrofuran, Chloroform oder deren Gemischen, insbesondere in Cyclohexan durchgeführt, wobei vorzugsweise Ethylenglykoldimethacrylat, Divinylbenzol, Ditaconsäurealkylamide, -arylamide, Divinylalkyl- oder -arylverbindungen als Crosslinker verwendet werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird das nach dem Präzipitationsschritt (siehe Fig. 3 und 4) erhaltene derivatisierte Imprint-Polypeptid in einem organischen Lösungsmittel suspendiert, einer oder mehreren der o.g. Crosslinker hinzugegeben, der Radikalstarter, z. B. Azobisverbindungen (α,α' -Azo-isobutyronitril (AIBN) oder 2,2'-Azo-bis-(2,4-dimethylvaleriansäurenitril (ABDV)), zugesetzt und die Copolymerisation durch UV-Strahlung gestartet. Die kovalente Fixierung der Polypeptidkonformation erfolgt selektiv über die zuvor eingeführten olefinischen Doppelbindungen, die wichtigen freien Funktionalitäten des Imprint-Polypeptids werden durch diesen Schritt nicht blockiert. Damit ist die imprintete Konformation kovalent fixiert und im wässrigen und organischen Lösungsmittelsystem nutzbar.

Das in seiner Konformation fixierte und stabilisierte, kovalent vernetzte, Imprint-Polypeptid ist unter vielen Bedingungen einsetzbar unter denen es ohne die selektive Einführung von Resten und die Copolymerisation instabil gewesen wäre, z. B. in wässrigen Lösungsmittelsystemen.

In einer weiteren Ausführungsform wird ein Polypeptid durch die kovalente Einführung von polymerisierbaren, ungesättigten Bindungen enthaltenden Gruppen derivatisiert. Das Polypeptid kann aus der vorstehend genannten Gruppe ausgewählt werden. Die Derivatisierung kann wie für den Schritt (A) vorstehend beschrieben durchgeführt werden.

Sodann wird das Polypeptid mit einem Printmolekül in einem wässrigen Medium imprintet (geprägt). Das Printmolekül kann wie vorstehend beschrieben ausgewählt werden. Vorzugsweise wird als Polypeptid ein natives Enzym und als Printmolekül das Substrat dieses Enzyms verwendet.

Anschließend wird die Copolymerisation in einem wässrigen Lösungsmittel mit einem Crosslinker durchgeführt, der mit den polymerisierbaren, ungesättigten Bindungen enthaltenden Gruppen copolymerisierbar ist. Die Copolymerisation wird wie vorstehend für den Schritt (D) beschrieben durchgeführt. Die Crosslinker werden vorzugsweise aus den vorstehend beschriebenen Gruppen ausgewählt. Der Crosslinker wird so gewählt, daß er in dem wässrigen Lösungsmittel löslich ist. Vorzugsweise wird als Crosslinker N,N'-Methylen-bisacrylamid verwendet.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele veranschaulicht.

DE 196 27 162 C1

Beispiel 1

Schonende Einführung von olefinischen Gruppen in Polypeptide

A. Vinylierung von α -Chymotrypsin (EC 3.4.21.1) mit Itaconsäureanhydrid

Unter Rühren wird α -Chymotrypsin in 10 ml 0,05 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,8 gelöst. Bei Raumtemperatur wird anschließend spatelspitzenweise Itaconsäureanhydrid hinzugefügt. Die bei jeder Zugabe des Anhydrids auftretende Erniedrigung des pH Wertes der Reaktionslösung wird durch Zugabe von 5 M NaOH korrigiert. Nach Beendigung der Zugabe des Anhydrids wird noch 1 Stunde gerührt und der pH Wert nochmals korrigiert. Die erhaltene Reaktionslösung wird zur Abtrennung der niedermolekularen Komponenten mit Hilfe von PD 10 Gelfiltrationssäulen (Pharmacia) in 0,05 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,8 umgepuffert und schließlich lyophilisiert. Die enzymatische Aktivität von α -Chymotrypsin wird anhand der Hydrolyse von Benzoyl-L-Tyrosinethylester in einem photometrischen Test ermittelt. Das Ausmaß der Modifizierung der funktionellen Gruppen wird mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS Assay) bestimmt (Habeeb A.F.S.A. (1966), Anal. Biochem. 14; 328-336). Tab. 1 zeigt die Reaktionsansätze, das jeweilige Ausmaß der Modifizierung der funktionellen Gruppen sowie die enzymatischen Aktivitäten der α -Chymotrypsin Derivate im Verhältnis zum freien Enzym.

Tabelle 1

Derivatisierung von α -Chymotrypsin mit Itaconsäureanhydrid

Zur Derivatisierung eingesetzte α -Chymotrypsin-Aktivität [nKat]	Itaconsäureanhydrid [mg]	Restaktivität des Derivats [%]	Modifizierung an funktionellen Gruppen [%]
2765	1,25	32	24
2765	2,5	31	27
2765	10	30	57
2765	30	30	66
2765	60	18	75

B. Vinylierung der β -Glucosidase aus der Mandel (EC 3.2.1.21) mit Itaconsäureanhydrid

Unter Rühren wird die β -Glucosidase in 10 ml 0,05 M Citronensäure-Phosphat-Puffer pH 6,0 gelöst. Zur Stabilisierung des Enzyms kann D(+)-Glucose zugesetzt werden. Bei Raumtemperatur wird anschließend spatelspitzenweise Itaconsäureanhydrid hinzugefügt. Die bei jeder Zugabe des Anhydrids auftretende Erniedrigung des pH Wertes der Reaktionslösung wird durch Zugabe von 5 M NaOH korrigiert. Nach Beendigung der Zugabe des Anhydrids wird noch 1 Stunde gerührt und der pH Wert nochmals korrigiert. Die erhaltene Reaktionslösung wird zur Abtrennung der niedermolekularen Komponenten mit Hilfe von PD 10 Gelfiltrationssäulen (Pharmacia) in 0,05 M Citronensäure-Phosphat-Puffer pH 6,0 umgepuffert und schließlich lyophilisiert. Die enzymatische Aktivität der β -Glucosidase wird anhand der Hydrolyse von 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid in einem photometrischen Test ermittelt. Das Ausmaß der Modifizierung der funktionellen Gruppen wird mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS Assay) bestimmt. Tab. 2 zeigt die Reaktionsansätze, das jeweilige Ausmaß der Modifizierung der funktionellen Gruppen sowie die enzymatischen Aktivitäten der β -Glucosidase Derivate im Verhältnis zum freien Enzym. Zum Schutz des aktiven Zentrums des Polypeptids wurde als Additiv Glucose hinzugegeben. In Gegenwart von 3M Glucose konnten 99% Restaktivität nach Derivatisierung erhalten werden.

DE 196 27 162 C1

Tabelle 2

Derivatisierung der β -Glucosidase mit Itaconsäureanhydrid

Zur Derivatisierung eingesetzte β -Glucosidase-Aktivität [nKat]	Itaconsäureanhydrid [mg]	D(+)-Glucose [M]	Restaktivität des Derivats [%]	Modifizierung der funktionellen Gruppen [%]
3678	500	/	21	100
3678	250	/	36	100
3678	130	/	55	99
3678	130	2	85	99
3678	130	3	99	98

Beispiel 2

Reaktivität von Itaconsäureanhydrid mit den Seitenketten von Polypeptiden

In 5 ml 0,05 M Citronensäure-Phosphat-Puffer pH 7,5 werden verschiedene α -N-Acetyl-(L)-Aminosäuren gelöst, unter Rühren mit Itaconsäureanhydrid versetzt und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der TNBS Assay wird je Ansatz mit einer Probe der im Puffer gelösten α -N-Acetyl-(L)-Aminosäure und mit der mit Itaconsäureanhydrid inkubierten α -N-Acetyl-(L)-Aminosäure durchgeführt.

Es kann festgestellt werden, daß Itaconsäureanhydrid mit den Aminogruppen von α -N-Acetyl-(L)-Lysin und α -N-Acetyl-(L)-Glutamin, mit der Sulfhydrylgruppe von α -N-Acetyl-(L)-Cystein, mit den Hydroxygruppen von α -N-Acetyl-(L)-Tyrosin und α -N-Acetyl-(L)-Serin zu reagieren vermag (Tab. 3). Die Reaktivitäten des Itaconsäureanhydrids gegenüber den Aminosäureseitenketten waren Ser > Tyr > Glu > Lys > Cys.

Tabelle 3

Untersuchungen zur Reaktivität von Itaconsäureanhydrid^a

N-Acetyl-(L)-Aminosäure	Funktioneller Rest	Maß an Modifikation ^b (%)
α -N-Acetyl-(L)-Serin	-OH	96
α -N-Acetyl-(L)-Tyrosin	-OH	89
α -N-Acetyl-(L)-Glutamin	-C(O)NH ₂	81
α -N-Acetyl-(L)-Lysin	-CH ₂ NH ₂	68
α -N-Acetyl-(L)-Cystein	-CH ₂ SH	15
α -N-Acetyl-(L)-Asparagin	-C(O)NH ₂	0
α -N-Acetyl-(L)-Arginin	-C(NH ₂)NH ₂ ⁺	0

^aIm 10-fachen Molüberschuß zugegeben.

^bNach 1h Reaktionszeit; gemessen mit TNBS.

Zur Stabilität der o.g. Bindungen ist festzuhalten, daß beispielsweise primäre Aminogruppen mit Itaconsäureanhydrid zu Amidbindungen führen, die von pH 1–12 und bei Temperaturen bis zu 70°C stabil sind (R. Kölle, 1995, Dissertation, TU Braunschweig, Deutschland, 53–59).

Beispiel 3

Herstellung eines fixierten, Imprint-Polypeptids

30 mg des mit Itaconsäureanhydrid derivatisierten α -Chymotrypsins aus Beispiel 1 (Ausmaß der Modifizierung = 70%) werden in 1 ml 0,01 M Natrium-Phosphat-Puffer pH 7,8 gelöst. Der Puffer enthält N-Ac-(D)-Trp in

DE 196 27 162 C1

einer Konzentration von 0,02 M. Die Lösung wird auf 0°C gekühlt und mit 4 ml 1-Propanol, das auf -20°C gekühlt wurde, versetzt. Das resultierende Präzipitat wird zentrifugiert, mit 10 ml 1-Propanol gewaschen und schließlich lyophilisiert. In 0,5 ml Cyclohexan werden 340 mg Ethylenglykoldimethacrylat und 4 mg 2,2'-Azo-bis-(2-methylpropionsäurenitril) gelöst. Darin werden 5 mg Lyophilisat suspendiert. Die Copolymerisation wird mittels UV-Licht initiiert. Die Copolymerisationsdauer beträgt 4 Stunden. Das kovalent vernetzte und imprintete α -Chymotrypsin (vernetztes, Imprint-Polypeptid; VIP) wird mit Cyclohexan gewaschen und lyophilisiert (siehe Fig. 3).

Zur Überprüfung, ob das derivatisierte, imprintete (ISA/impr Chy) bzw. das vernetzte, imprintete Chymotrypsin (VIP) die imprintete Eigenschaft im organischen Lösungsmittelsystem gleich dem nativen, imprinteten Chymotrypsin (na/impr Chy) besaß, wurden alle drei Imprint-Polypeptide zur Synthese von N-Ac-(D)-TrpEE in Cyclohexan getestet (Fig. 5; Analytik mit HPLC, siehe Stähel et al. 1991). Es wurde ersichtlich, daß das ISA/impr Chy und VIP in den ersten 100 h bessere Aktivitäten hatten, als das na/impr Chy. Die kinetischen Effekte nach 100h Umsetzung sind auf den Einfluß des freiverwendenden Wassers bei der enzymatischen Kondensationsreaktion im organischen Lösungsmittel zurückzuführen.

Beispiel 4

Einsatz des vernetzten Imprint-Polypeptids (VIP) im wässrigen Medium

Das VIP wird in Phosphat-Puffer (10 mM), pH 7,8 suspendiert und bei 27°C ca. 10 min in einem Thermoschüttler vorinkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe des Substrates, dem N-Acetyl-(D)-tryptophanethylester (10 mM), gestartet. Das VIP zeigte eine spezifische (D)-Esterhydrolyse-Aktivität von 0,04 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g})$. Das native nicht-geprintete, das nichtvernetzte imprintete und das nicht-imprintete vernetzte α -Chymotrypsin besaßen keinerlei (D)-Esterhydrolyse-Aktivität.

Beispiel 5

Einsatz des vernetzten Imprint-Polypeptids (VIP) im organischen Lösungsmittel nach Vorinkubation (1h) im wässrigen Lösungsmittelsystem

A. Das VIP wurde für 1h in einem Phosphat-Puffer (10 mM), pH 7,8, bei 25°C inkubiert. Nach Lyophilisation des Ansatzes wurde das VIP in Cyclohexan suspendiert. Nach Zugabe von N-Ac-(D)-Trp (10 mM) und 20% (v/v) Ethanol wurde die N-Acetyl-(D)-tryptophanethylester-Synthese bei 25°C im Thermoschüttler gestartet. Das VIP zeigte eine spezifische (D)-Esterhydrolyse-Aktivität von 0,02 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g})$. Die imprintete Eigenschaft ging somit nicht im wässrigen Lösungsmittelsystem verloren.

B. Wie in Beispiel 5A. beschrieben, jedoch unter Verwendung von N-Ac-(D)-Tyrosin anstelle von N-Ac-(D)-Trp.

C. Wie in Beispiel 5A. beschrieben, jedoch unter Verwendung von N-Ac-(D)-Phenylalanin anstelle von N-Ac-(D)-Trp.

Beispiel 6

Herstellung eines fixierten, Imprint-Polypeptids zur selektiven Adsorption

50 mg Rinderserumalbumin werden in 10 ml 0,05 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 5,5 gelöst. Bei Raumtemperatur wird anschließend unter Rühren spatelspitzenweise Itaconsäureanhydrid hinzugefügt. Die bei jeder Zugabe des Anhydrids auftretende Erniedrigung des pH Wertes der Reaktionslösung wird durch Zugabe von 5 M NaOH korrigiert. Nach Beendigung der Zugabe des Anhydrids wird noch 1 Stunde gerührt und der pH Wert nochmals korrigiert. Die erhaltene Reaktionslösung wird zur Abtrennung der niedermolekularen Komponenten mit Hilfe von PD 10 Gelfiltrationssäulen (Pharmacia) in 0,05 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 5,5 umgepuffert und schließlich lyophilisiert.

Das Ausmaß der Modifizierung der funktionellen Gruppen wird mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS Assay) bestimmt.

30 mg des mit Itaconsäureanhydrid derivatisierten Rinderserumalbumins (Ausmaß der Modifizierung -- 85%) werden in 4 ml H₂O dest. gelöst. Die wässrige Lösung enthält L-Äpfelsäure in einer Konzentration von 0,5 M. Die Lösung wird bei pH 5,5 auf 0°C gekühlt und mit 4 ml 1-Propanol, das auf -20°C gekühlt wurde, versetzt. Das resultierende Präzipitat wird zentrifugiert, mit 10 ml 1-Propanol gewaschen und schließlich lyophilisiert.

In 0,5 ml Cyclohexan werden 340 mg Ethylenglykoldimethacrylat mit 4 mg 2,2'-Azo-bis-(2-methylpropionsäurenitril) gelöst. Darin werden 10 mg Lyophilisat suspendiert. Die Copolymerisation wird mittels UV-Licht initiiert. Die Copolymerisationsdauer beträgt 4 Stunden. Das kovalent vernetzte und imprintete Rinderserumalbumin wird mit Cyclohexan gewaschen und lyophilisiert.

Wie bei Dabulis und Klibanov, Biotechnol. Bioeng. 39 (1991), 176--185, beschrieben, wurde das Ausmaß der Bindungsaffinität des imprinteten Rinderserumalbumins zu L-Äpfelsäure untersucht. Dabei zeigte sich, daß sowohl das imprintete als auch das vernetzte, imprintete Rinderserumalbumin in Ethylacetat Bindungsaffinität zu L-Äpfelsäure aufwiesen. Im wässrigen Medium war lediglich das vernetzte, imprintete Rinderserumalbumin in der Lage, L-Äpfelsäure selektiv zu adsorbieren.

DE 196 27 162 C1

Beispiel 7

Herstellung eines nativen, fixierten Polypeptids

- 5 In 29 ml 0,05 M Citronensäure-Phosphat-Puffer pH 6,0 werden 50 mg der zu 98% derivatisierten β -Glucosidase (siehe Tab. 2) und 250 mg N,N'-Methylenbisacrylamid gelöst. Die Copolymerisation wird durch Zugabe von 0,5 ml einer Ammoniumperoxodisulfatlösung (5% w/v) und 0,5 ml einer 3-Dimethylaminopropionitrillösung (5% v/v) gestartet. Nach einer Reaktionszeit von 5 Stunden wird das Copolymerisat in einem Faltenfilter zunächst mit 0,5 Liter 0,5 M NaCl Lösung und dann mit 2 Liter H₂O dest. bis zur Salzfreiheit gewaschen. Das Copolymerisat wird in 0,05 M Citronensäure-Phosphat-Puffer pH 6,0 aufgenommen und anschließend lyophilisiert.
- 10 Die enorme Stabilisierung des vernetzten Polypeptids gegenüber dem nativen, nicht-vernetzten ist aus Tab. 4 ersichtlich, in der die Halbwertszeiten des Polypeptids bei verschiedenen Temperaturen angegeben sind.

Tabelle 4

Halbwertszeiten der katalytisch aktiven Konformation der freien und vernetzten β -Glucosidase

Biokatalysatorform	$t_{1/2}$ (Tage)		
	30°C	37°C	56°C
ISA-Acrylamid-			
vernetztes Polypeptid	51,6	8,7	2,4
natives Enzym	8,7	1,4	0,25

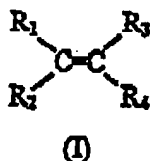
Literatur

- 30 Daboufs, K. and Klibanow, A. (1992). *Biotechnol. Bioeng.* 39, 176–185.
 Fritz, H., Neudecker, M., Schult, H. and Werle, E. (1965). *Angew. Chem.* 78, 775.
 Goldstein, L. (1970). *Methods Enzymol.* 19, 935–962.
 Habeeb, A. F. S. A. (1966). *Anal. Biochem.* 14, 328–336.
 35 Külle, R. (1995) Dissertation, TU Braunschweig, Deutschland, 53–59.
 Mosbach, K. and Ramström, O. (1996). *Bio/Technology* 14, 163–170.
 Russell, A. J. and Klibanow, A. M. (1988). *J. Biol. Chem.* 263, 11624–11626.
 Ståhl, M., Jeppson-Wistrand, U., Månsson, M.-O. and Mosbach, K. (1991). *J. Am. Chem. Soc.* 113, 9366–9368.
 Ståhl, M., Månsson, M.-O. and Mosbach, K. (1990). *Biotechnol. Lett.* 12, 161–166.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von in ihrer Konformation fixierten und stabilisierten, kovalent vernetzten Imprint-Polypeptiden, die sowohl in wässrigen als auch in organischen Lösungsmittelsystemen stabil sind, umfassend die folgenden Schritte:
- 45 (A) kovalente Einführung von polymerisierbaren, ungesättigte Bindungen enthaltenden Gruppen in ein Polypeptid;
 (B) Imprinting des in Schritt (A) erhaltenen Polypeptids mit einem Printmolekül in einem wässrigen Medium;
 50 (C) Präzipitation des in Schritt (B) erhaltenen Polypeptid/Printmolekül-Gemisches durch Zugabe eines zur Präzipitation geeigneten Additivs und/oder Gefriertrocknen des in Schritt (B) erhaltenen Polypeptid/Printmolekül-Gemisches; und
 (D) Copolymerisation des in Schritt (C) erhaltenen Imprint-Polypeptids in einem organischen Lösungsmittel mit einem Crosslinker, der mit den polymerisierbaren, ungesättigte Bindungen enthaltenden Gruppen copolymerisierbar ist.
- 55 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Schritt (B) vor Schritt (A) durchgeführt wird.
 3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Schritte (A) und (B) gleichzeitig durchgeführt werden.
 4. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß ein Polypeptid mit OH-, und/oder NH₂- und/oder SH-Gruppen verwendet wird, die teilweise oder komplett mit den polymerisierbaren, ungesättigte Bindungen enthaltenden Verbindungen unter Ausbildung von kovalenten Bindungen derivatisiert werden.
 5. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß ein natives Protein, insbesondere ein Enzym, als Polypeptid verwendet wird.
 65 6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß die in Schritt (A) verwendeten ungesättigte Bindungen enthaltenden Verbindungen oder deren Gemische ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus reaktiven Analoga bzw. Derivaten der allgemeinen Formel (I)

DE 196 27 162 C1



wobei die Reste R_1 , R_2 , R_3 und R_4 unabhängig voneinander Wasserstoffatome, Carboxylreste, cyclische oder lineare, substituierte oder unsubstituierte, gesättigte oder ungesättigte Alkylreste, Alkoxyreste oder Carboxyalkylreste mit vorzugsweise bis zu 10, bevorzugter bis zu 6, insbesondere 1 oder 2 Kohlenstoffatomen oder substituierte oder unsubstituierte Arylreste oder Carboxyarylreste sind, mit der Maßgabe, daß mindestens einer der Reste R_1 , R_2 , R_3 und R_4 unabhängig voneinander ein Carboxyl-, Carboxyalkylrest oder Carboxyarylrest ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die in Schritt (A) verwendeten ungesättigten Bindungen enthaltenden Verbindungen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Itacon-, Maleim-, Citracon-, Croton-, Methacryl-, Acrylsäure sowie deren Anhydriden und Säurehalogeniden.

8. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt (A) zusätzlich Polivale und/oder Salze zugegeben werden.

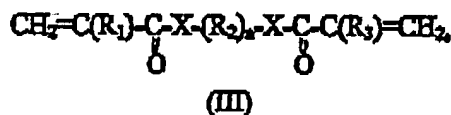
9. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß der zur Copolymerisation in Schritt (D) verwendete Crosslinker ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Analoga bzw. Derivaten der allgemeinen Formel (II)



wobei die Reste R_1 und R_3 unabhängig voneinander Wasserstoffatome, cyclische oder lineare, ungesättigte oder gesättigte, substituierte oder unsubstituierte Alkyl-, Carboxyl-, Carboxyalkyl- oder Alkyletherreste mit vorzugsweise bis zu 10, insbesondere 1 oder 2 Kohlenstoffatomen oder substituierte oder unsubstituierte Arylreste sind und der Rest R_2 ein cyclischer oder linearer, gesättigter oder ungesättigter, substituiert oder unsubstituierter Alkyl- oder Alkyletherrest mit vorzugsweise bis zu 10, insbesondere 1 oder 2 Kohlenstoffatomen oder ein Arylrest ist und n einen Wert von vorzugsweise bis zu 10 und insbesondere 1 oder 2 hat.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der zur Copolymerisation in Schritt (D) verwendete Crosslinker ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Divinylalkyl- und Divinylarylverbindungen.

11. Verfahren nach Anspruch 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der zur Copolymerisation in Schritt (D) verwendete Crosslinker ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Analoga bzw. Derivaten der allgemeinen Formel (III)



wobei die Reste R_1 , R_2 und R_3 und n die in Anspruch 9 für die allgemeine Formel (II) genannte Bedeutung haben und der Rest X ein Sauerstoffatom oder die Gruppe $-NH$ ist.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß der zur Copolymerisation in Schritt (D) verwendete Crosslinker ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Ethylenglykoldimethacrylat, N,N'-Methylen-bis-acrylamid, Diäconsäurealkylamiden und Diäconsäurearylamiden.

13. Verfahren zu Herstellung eines in seiner Konformation fixierten und stabilisierten, kovalent vernetzten Imprint-Polypeptids, das sowohl in wässrigen als auch in organischen Lösungsmittelsystemen stabil ist, umfassend die folgenden Schritte:

(A) kovalente Einführung von polymerisierbaren, ungesättigte Bindungen enthaltenden Gruppen in ein Polypeptid in einem wässrigen Medium:

(B) Imprinting des in Schritt (A) erhaltenen Polypeptids mit einem Printmolekül in einem wässrigen Medium; und

(C) Copolymerisation des in Schritt (B) erhaltenen Polypeptids in einem wässrigen Medium mit einem Crosslinker, der mit den polymerisierbaren, ungesättigte Bindungen enthaltenden Gruppen copolymerisierbar ist.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß Schritt (B) vor Schritt (A) durchgeführt wird.

15. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Schritte (A) und (B) gleichzeitig durchgeführt werden.

16. In seiner Konformation fixiertes und stabilisiertes, kovalent vernetztes Imprint-Polypeptid, das sowohl in wässrigen als auch in organischen Lösungsmittelsystemen stabil ist, erhältlich durch ein Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche.

17. Verwendung eines Polypeptids nach Anspruch 16 in katalytischen, chromatographischen und/oder analytischen Verfahren, die in wässrigen oder organischen Lösungsmittelsystemen durchgeführt werden.

DE 196 27 162 C1

18. Verwendung eines Polypeptids nach Anspruch 16 zur katalytischen Synthese, Chromatographie und Analytik von chiralen Verbindungen.

19. Verwendung eines Polypeptids nach Anspruch 16 in der Biosensortechnik zur spezifischen Erkennung von Molekülen.

5

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ZEICHNUNGEN SEITE 1

Nummer:

DE 195 27 162 C1

Int. Cl. 8:

C 07 K 14/435

Veröffentlichungstag: 7. August 1997

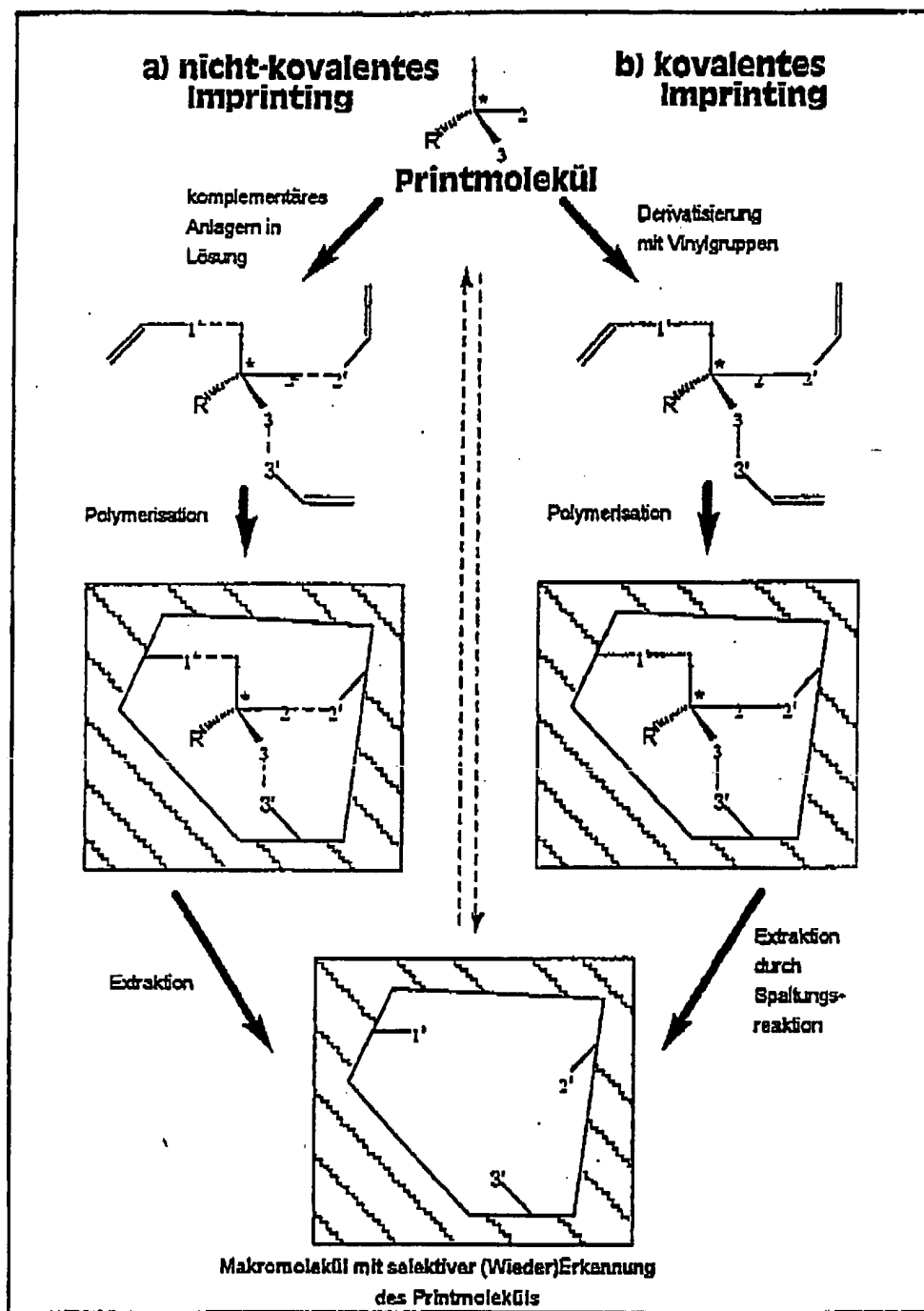


Fig. 1: Variante 1:
a) nicht-kovalentes und
b) kovalentes Imprinting
[\longleftrightarrow] = (Wieder)Erkennung; a) Assoziation/Dissoziation; b) Bildung/Spaltung von kovalenten Bindungen; Zahlen = funktionelle Gruppen].
Alle Schritte finden in organischen Lösungsmittelsystemen statt.

ZEICHNUNGEN SEITE 2

Nummer:

DE 196 27 162 C1

Int. CL⁸:

G 07 K 14/435

Veröffentlichungstag: 7. August 1997

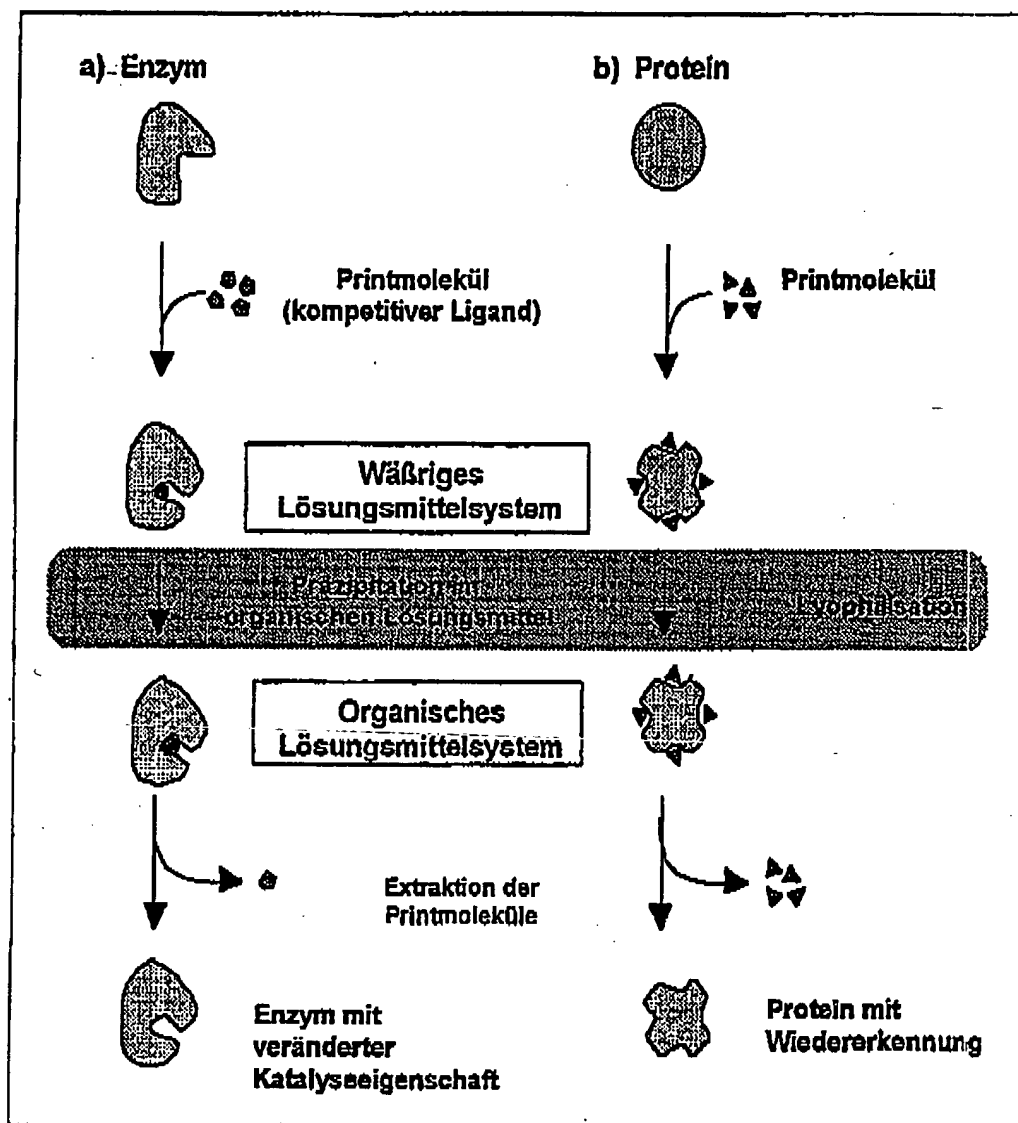


Fig. 2: Variante 2:
 a) Modifikation der Katalyseeigenschaft;
 b) Erzeugung von Affinität (Wiedererkennung)

ZEICHNUNGEN: SEITE 3

Nummer:

DE 198 27 162 C1

Int. Cl.:

C 07 K 14/436

Veröffentlichungstag: 7. August 1997

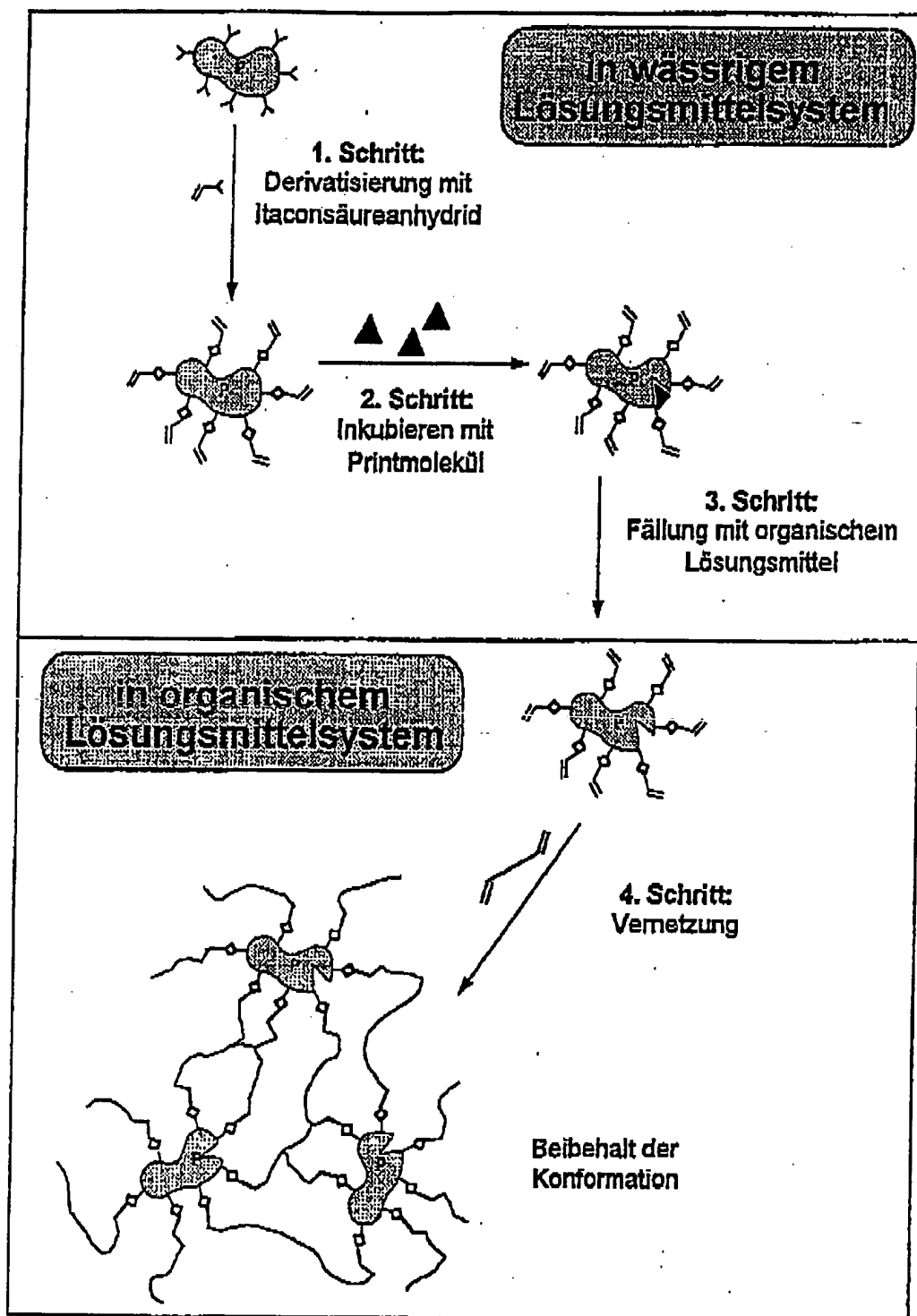


Fig. 3: Schematische Darstellung des Verfahrens zur Fixierung und Stabilisierung von Polypeptiden. Die Derivatisierung mit olefinischen Gruppen erfolgt vor dem Imprinting (P = Polypeptid)

ZEICHNUNGEN SEITE 4

Nummer:

DE 198 27 162 C1

Int. Cl. 8:

C 07 K 14/435

Veröffentlichungstag: 7. August 1997

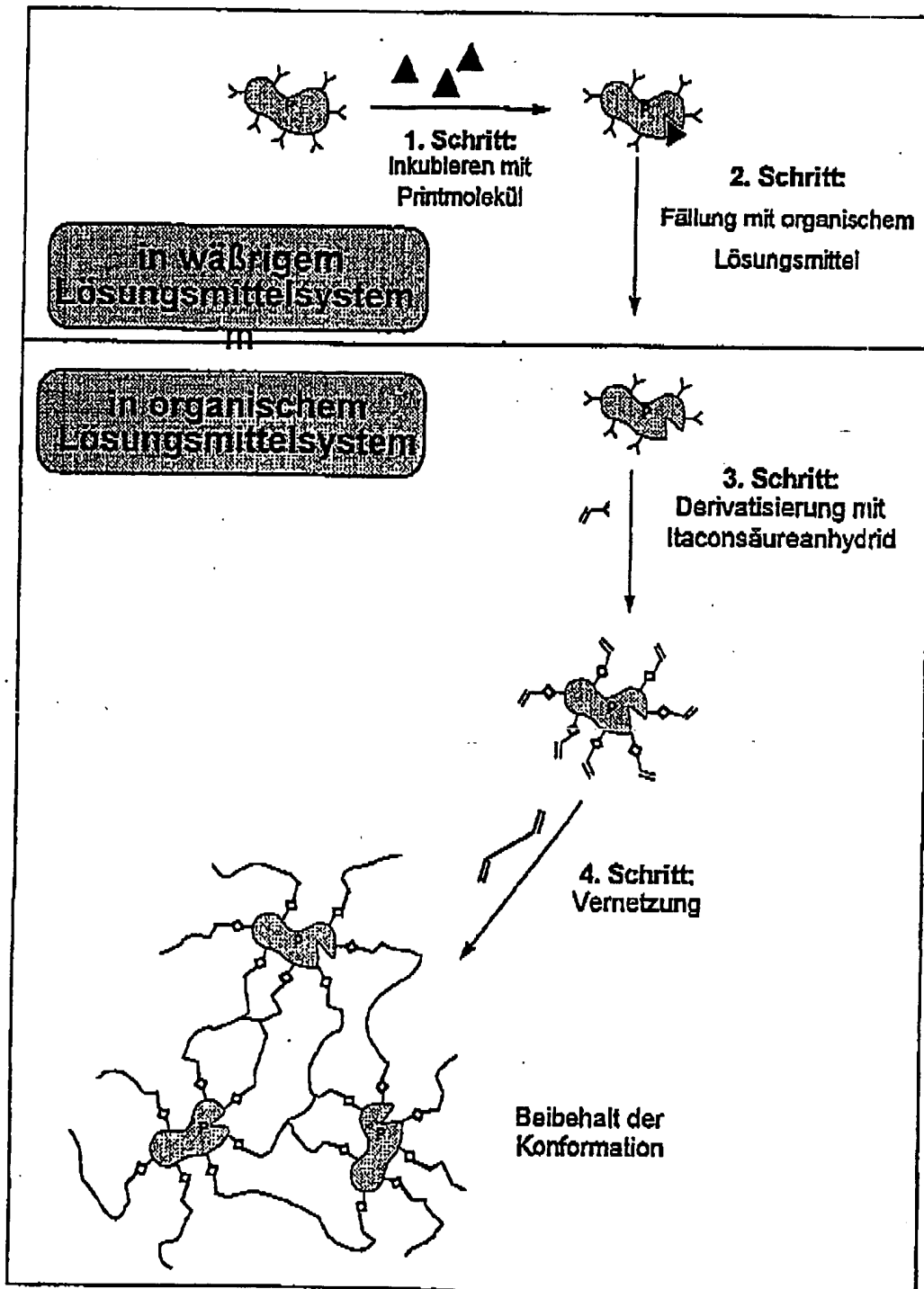


Fig. 4: Schematische Darstellung des Verfahrens zur Fixierung und Stabilisierung von Polypeptiden. Die Derivatisierung mit olefinischen Gruppen erfolgt nach dem Imprinting (P = Polypeptid)

ZEICHNUNGEN: SEITE 5

Nummer: DE 198 27 152 C1
 Int. Cl.⁸: C 07 K 14/435
 Veröffentlichungstag: 7. August 1997

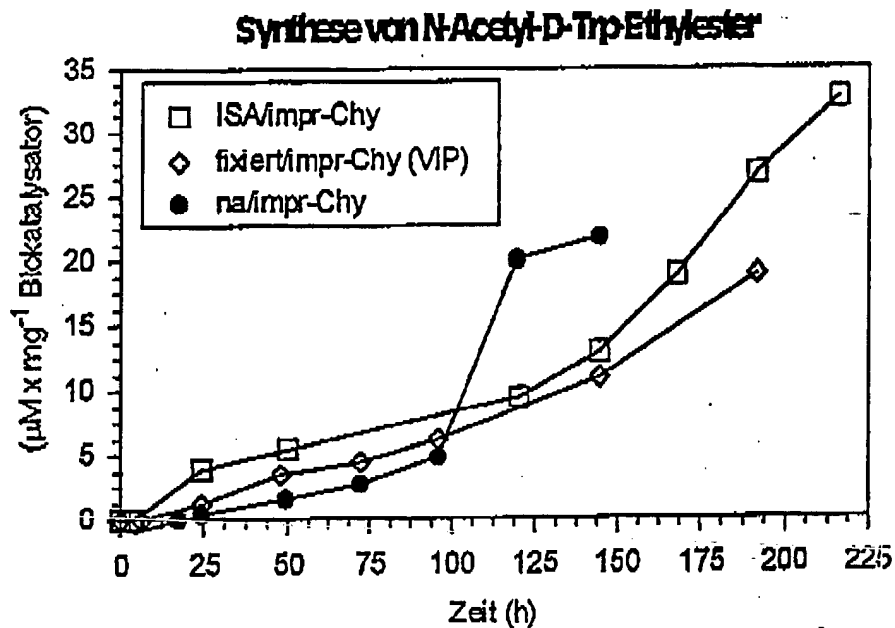


Fig.5: Überprüfung der "maßgeschneiderten" Eigenschaft imprinteter Polypeptide

- i) Itaconsäureanhydrid(ISA)-modifiziertes/imprintetes α -Chymotrypsin (ISA/impr-Chy)
- ii) ISA-modifiziertes/imprintetes/vernetztes α -Chymotrypsin (fixiert/impr-Chy, auch VIP genannt)
- iii) natives/imprintetes α -Chymotrypsin (na/impr-Chy)

**PThis Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ ~~BLACK BORDERS~~

☒ ~~IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES~~

☒ ~~FADED TEXT OR DRAWING~~

☒ ~~BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING~~

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ ~~LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT~~

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.